

ZUR KINETIK DER VIRUSVERMEHRUNG UND

IHRE BEEINFLUSSUNG UNTER CORTISON

von

HANS STAUTER

Mainz 1963



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Hygiene-Institut der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
(ehem. Direktor: Professor Dr. Heinrich Kliewe)
(jetziger Direktor: Professor Dr. Joachim Borneff)

ZUR KINETIK DER VIRUSVERMEHRUNG UND
IHRE BEEINFLUSSUNG UNTER CORTISON

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Hohen Medizinischen Fakultät der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

HANS STAUTER

aus Reinsfeld

MAINZ 1963

Dekan: Professor Dr. H. Bredt
Referent: Professor Dr. E. von Wasielewski
Korreferent: Professor Dr. H. Kliewe
Tag der mündl. Prüfung: 19. November 1963



Gesamtherstellung: DITTERS BÜRODIENST MAINZ
Augustinerstraße 64-66

INFEKTIONS- UND VERMEHRUNGSMECHANISMEN BEIM VIRUSINFEKT

Die Viren haben als Krankheitserreger eine sehr große medizinische Bedeutung, weil die durch sie verursachten hochinfektiösen Krankheiten nicht nur bei den Menschen, sondern auch bei den Haustieren (Maul- und Klauenseuche, Schweineseuche usw.) und den Kulturpflanzen (Tabakmosaikkrankheit u.a.) großen Schaden anrichten. Als kleinste aller Erreger ($250 \text{ m}\mu$ - $10 \text{ m}\mu$) entziehen sie sich größtenteils dem lichtmikroskopischen Nachweis. Nur im Elektronenmikroskop sind Einzelheiten ihrer Struktur sichtbar. Schließlich gibt es Viren, die man nicht bzw. noch nicht sehen kann, deren Existenz aber aus anderen Gründen gefordert werden muß (25, 15). Im Gegensatz zu den Bakterien, die einen eigenen Stoffwechsel besitzen, sind sie zu ihrer Vermehrung ausschließlich auf den Stoffwechsel lebender Zellen angewiesen (8). Sie gedeihen daher nicht auf den üblichen festen und flüssigen Nährböden. Zur Viruszüchtung bedient man sich entweder des Versuchstieres, wozu auch das Brutei zählt, oder der Gewebekultur. Die Virusvermehrung ist stets an eine Zellinfektion gebunden. Dieser Vorgang beginnt mit der Anlagerung des Virus an die Zelloberfläche = Adsorption (7, 20); es haftet an besonderen "Receptoren" der Zellmembran, zu denen es eine gewisse Affinität zeigt. Bei Untersuchungen an Phagen hat man festgestellt, daß die Bindung an den Receptor durch die proteinhaltige Hülle des Phagen hervorgerufen wird. Diese Hülle bleibt im weiteren Verlauf der Zellinfektion außen an der Zellmembran, und nur der nucleinsäurehaltige Kern tritt in die Zelle ein (Penetration) (64), um hier die Virusvermehrung anzuregen. Eigentümlicherweise zerfallen die Viruspartikel kurz nach dem Eindringen in die Zelle, verlieren ihre Infektiosität und sind mit keiner Methode nachweisbar. Hierauf beruht die Tatsache, daß bei experimentellen Virusinfektionen nach einer gewissen Zeit (Penetrationszeit) der Virusgehalt nur noch ein Bruchteil der Infektionsdosis beträgt, welches Phänomen man als Eklipse bezeichnet (28, 33). Nach dem Eindringen in die Zelle findet eine vorübergehende Stimulation des Zellstoffwechsels statt (12, 64). Die Nucleoli, die bekannterweise eine große Rolle im Zelleiweißstoffwechsel spielen, vergrößern sich; ebenfalls wird das Volumen der Zytoplasmanucleotide vermehrt. Das weitere Schicksal wird durch folgende 3 Möglichkeiten bestimmt:

1. Die Zelle platzt und entleert die nun infektiösen Viruspartikel.
2. Das Virus wird als Einschlußkörperchen fixiert.
3. Die Zelle wird mitsamt dem Virus vernichtet (4, 12, 64).

Die Reaktionen der Gewebe auf die Virusvermehrung kann man in folgende Teilkomponenten zerlegen, die sich im klinischen Bild natürlich überlagern:

- a) Hyperplasie
- b) Nekrose
- c) Sekundäre Entzündungserscheinungen im benachbarten Gewebe auf die toxischen Produkte der nekrotischen Zellen.

Eine weitere Eigentümlichkeit der Virusvermehrung ist das Phänomen der Interferenz. Jede Zelle, die von einem Virus befallen ist, soll einen spezifischen Stoff Interferon abgeben, der das Eindringen anderer Viren in die Zelle hemmen soll (34, 35, 36). Dieses Phänomen läßt sich nicht nur durch intakte pathogene Viren auslösen, sondern auch durch solche, deren infektiöse Eigenschaften durch spezielle Methoden inaktiviert wurden, wobei die Haemagglutination noch erhalten bleibt (34, 35, 36).

Man hat anfangs geglaubt, daß sich hieraus entscheidende therapeutische Möglichkeiten für die Behandlung von Viruserkrankungen ergeben würden, doch ist es heute noch fraglich, ob es sich bei dem Interferon überhaupt um einen spezifischen Stoff handelt (90).

GEGENÜBERSTELLUNG VON BAKTERIEN- UND VIRUSWACHSTUM

Die Vermehrungsphase des Erregers spielt beim Verlauf eines Infektes eine entscheidende Rolle, da hierbei die Überschwemmung des Körpers mit dem infektiösen Agens stattfindet (51). Zur Charakterisierung eines Krankheitsablaufes genügt nicht allein die Erforschung des Erregers und seiner biologischen Eigenschaften; sondern Reaktionslage und Konstitution des infizierten Organismus sind ebenfalls entscheidend für die Art des Krankheitsbildes; dies gilt generell sowohl für Virus- wie Bakterieninfekte. Während aber bei der bakteriellen Infektion der Verlauf von der Einwirkung spezifischer Endo- und Exotoxine beherrscht wird, die nicht nur am Vermehrungsort in Erscheinung treten, beruht die pathogene Wirkung der Viren hauptsächlich auf ihrer Vermehrung und der damit verknüpften Zellzerstörung (64).

Doch ist dieser Unterschied kein grundsätzlicher; denn auch beim Virusinfekt spielen toxische Abbauprodukte nekrotischer Zellen eine nicht minder große Rolle, wie uns aus den schweren Allgemeinreaktionen bei Viruserkrankungen bekannt ist. Allerdings sind diese Toxine nicht so spezifisch wie die Bakteriexotoxine.

Die Vermehrung von Bakterien verläuft auch ohne die Anwesenheit lebender

Zellen im Reagenzglas mehr oder weniger ungestört, je nach dem Vorhandensein von bestimmten notwendigen Nährstoffen und in Abhängigkeit von gewissen physikalischen Umweltbedingungen, wie Temperatur, pH usw. Das Wachstum der Bakterien in bestimmten Nährlösungen gibt wertvolle Aufschlüsse über ihre Physiologie und Biochemie. Eine Wachstumskurve eines Erregers erhalte ich, wenn ich im Koordinatensystem auf der einen Achse den Bakteriengehalt auftrage und ihn in Beziehung bringe zu den entsprechenden Zeiten auf der anderen Achse. Hierbei ist aber zu berücksichtigen, daß für die Bakteriengehaltsbestimmung die Zählung (direkte Methode) nur selten angewandt wird, sondern meist folgende indirekte Methoden in Frage kommen:

1. Trockengewichtsmethode
2. Stickstoffmethode
3. ID 50-Methode (die Verdünnung wird bestimmt, bei der 50% der Versuchstiere infiziert werden)
4. Photometrische Methode

Die Zahlenwerte, die ich auf diese Art erhalte, sind zwar proportional der Dichte der vorhandenen Erreger, sonst wären die Methoden natürlich unbrauchbar. Bestimme ich aber gleichzeitig den Bakteriengehalt mit mehreren Methoden, so ergeben sich oft nicht unerhebliche Unterschiede im Verlauf der Wachstumskurven. Es ist weiterhin von entscheidender Bedeutung, ob ich den Bakteriengehalt numerisch oder logarithmisch auftrage. Da das Wachstum im Sinne einer geometrischen Reihe vor sich geht, ist eine logarithmische Auftragung stets vorzuziehen. Das Wachstum einer Bakterienkultur ist durch folgende Formel mathematisch zu erfassen:

$$y_2 = y_1 \cdot 2^r (t_2 - t_1)$$

$$\log y_2 = \log y_1 + r (t_2 - t_1) \quad \text{Logarithmus zur Basis 2}$$

$$r = \frac{\log y_2 - \log y_1}{t_2 - t_1} = \text{Wachstumsgeschwindigkeit (63)}$$

(y_1 = Bakteriendichte zur Zeit t_1

(y_2 = Bakteriendichte zur Zeit t_2

(

(r = Zahl der Verdopplungen pro Zeiteinheit;

(

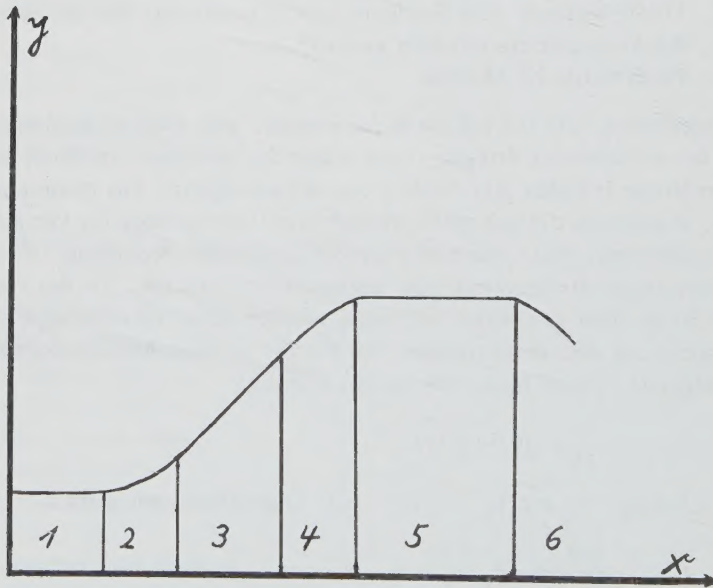
(= Maß für die Wachstumsgeschwindigkeit.

{

Ändert sich die Wachstumsgeschwindigkeit im Zeitintervall $t_2 - t_1$, so ist r nur ein Maß für die durchschnittliche Wachstumsgeschwindigkeit. Bei einer Bakterienwachstumskurve unterscheidet man im typischen Falle 6 Phasen (63):

1. "lag phase" = Latenzphase, Wachstumsgeschwindigkeit $r = 0$.
2. Beschleunigungsphase; r = ansteigend.
3. Exponentialphase; r = konstant.
4. Verzögerungsphase; Wachstumsgeschwindigkeit fällt ab.
5. Stationäre Phase; $r = 0$.
6. Reduktionsphase; r = negativ.

Siehe Kurve 1.



Kurve 1: Die typischen Wachstumsphasen einer Bakterienwachstumskurve; y-Achse = logarithmische Auftragung des Bakteriengehaltes (zur Basis 2). x-Achse = Auftragung der Zeit.

Die Wachstumsgeschwindigkeit in einem bestimmten Zeitpunkt ist mir durch die Steigung der Wachstumskurve in dem entsprechenden Kurvenpunkt gegeben, wobei die Steigung als der Tangens des Steigungswinkels definiert ist; oder mathematisch ausgedrückt: gilt für die Wachstumskurve die Beziehung $y = f(x)$, so gilt für die Wachstumsgeschwindigkeit die Beziehung $y' = f'(x)$ gleich 1. Ableitung der Funktion $y = f(x)$. Von den typischen 6 Phasen einer Bakterienwachstumskurve verdienen die 1. und 2. Phase besondere Beachtung, weil sie Ausdruck einer Anpassung des Erregers an die neuen Verhältnisse sind (30, 63). Der Unters

Der Unterschied zwischen dem neuen und dem vorhergehenden Milieu bewirkt eine vorübergehende Wachstumshemmung, weil die Bakterien, deren Enzymsystem noch auf die vorhergehenden Verhältnisse eingestellt ist, dieses erst der neuen Umwelt anpassen müssen. Diese Eigenart der Spaltpilze hat man sich schon lange in der Behandlung von Coliinfektionen der ableitenden Harnwege durch sog. "Schaukeldiät" zunutze gemacht. Allerdings geschieht diese Enzymanpassung, die uns gerade in letzter Zeit durch die zunehmende Resistenzentwicklung gegen Antibiotika sehr bekannt geworden ist, innerhalb einer für jede Bakterienart charakteristischen Variationsbreite. Diese Begrenzung der Variationsbreite ist sicherlich einer der Hauptgründe für die Tatsache, daß Infektion nicht immer eine Erkrankung nach sich zieht. Auch die übliche Erklärung dieser Tatsache durch bessere Konstitution oder Abwehrlage des entsprechenden Organismus ist letzten Endes ein Zeichen für die Fähigkeit, das "Milieu interieur" so zu ändern, daß es außerhalb der Variationsbreite des Erregers liegt. Das Wachstum einer Bakterienkultur kann durch 3 fundamentale Wachstumskonstanten gut charakterisiert werden (63).

I. Totales Wachstum = Differenz des initialen Bakteriengehaltes und des maximalen Bakteriengehaltes

$$G = y_{\max} - y_0 \quad (63).$$

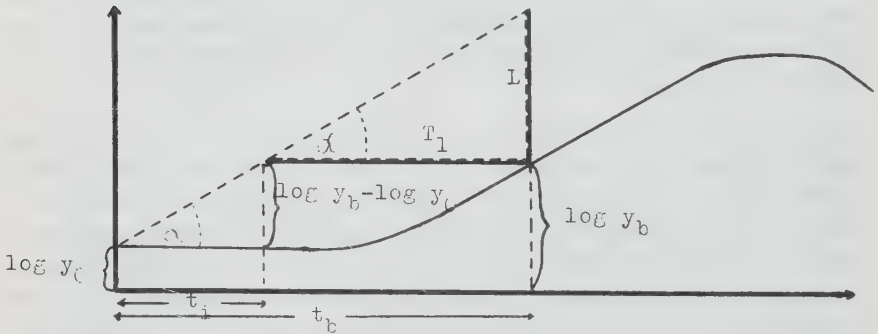
II. Exponentielle Wachstumsgeschwindigkeit = Wachstumsgeschwindigkeit der Exponentialphase.

Da die Wachstumsgeschwindigkeit innerhalb der Exponentialphase konstant ist, kann ich zu ihrer Berechnung 2 beliebige Werte innerhalb der Exponentialphase wählen.

R = Exponentielle Wachstumsgeschwindigkeit =

$$\frac{\log y_2 - \log y_1}{t_2 - t_1} \quad (63).$$

III. "Lag time" (58) ist nach Hinshelwood definiert, als die Differenz zwischen der objektiven Zeit, die gemessen wird bis zum Erreichen einer gewissen Bakteriendichte innerhalb der Exponentialphase und einer ideellen Zeit, nach der dieselbe Bakteriendichte erreicht worden wäre, wenn die Exponentialphase von Anfang an vorgeherrscht hätte.



- Kurve 2: Berechnung von T_1 = "Lag time" u. L = "Growth lag"
- $\log y_0$ = Bakteriendichte kurz nach Infizierung.
- $\log y_b$ = Bakteriendichte eines beliebigen Punktes der Exponentialphase.
- t_b = die gemessene Zeit bis zum Erreichen dieser Bakteriendichte.
- t_i = die ideelle Zeit, nach der die gleiche Bakteriendichte ($\log y_b$) schon erreicht worden wäre, wenn die Exponentialphase sofort nach Infizierung eingetreten wäre.

"Lag time" = $T_1 = t_b - t_i$; t_b ist mir objektiv durch die Messung gegeben und t_i durch die Beziehung

$$\operatorname{tg} \alpha = R = \frac{\log y_b - \log y_0}{t_i}$$

$$t_i = \frac{\log y_b - \log y_0}{R}$$

$$T_1 = t_b - \frac{\log y_b - \log y_0}{R} \quad (58, 63)$$

Eine andere Konstante zur Charakterisierung der 1. und 2. Phase einer Wachstumskurve = "Growth lag" (63) läßt sich aus der Kenntnis von T_1 ohne wei-

teres berechnen durch die aus Kurve 2 abzulesende Beziehung:

$$\operatorname{tg} \alpha = R = \frac{L}{T_1}$$

$$\text{"Growth lag"} = L \cdot T_1 \cdot R$$

Die Größe des totalen Wachstums = G wird, sofern man gewisse physikalische Bedingungen wie pH, Temperatur usw. konstant hält, durch den notwendigen Nährstoff bedingt, der im Minimum vorliegt; und zwar besteht eine strenge Proportionalität

$$G = K \cdot C \quad (63)$$

(G = Totales Wachstum

(

(C = Initiale Konzentration des Minimumstoffes

(

(K = eine Konstante bis zu jenem höchsten Wert von C , bei dem ein anderer notwendiger Stoff zum Minimumstoff wird.

Bis zu diesem höchsten Wert von C steigt das totale Wachstum linear mit steigenden Konzentrationen von C an; allerdings dürfen die Stoffwechselprodukte der Bakterien nicht überhandnehmen.

Für die Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit der Exponentialphase vom Minimumstoff gilt die Beziehung

$$R = R_M \cdot \frac{C}{C_1 + C} \quad (63)$$

(R_M = maximale Wachstumsgeschwindigkeit

(

(C = Konzentration des Minimumstoffes

(

(C_1 = die Konzentration des Minimumstoffes, bei der die Wachstumsgeschwindigkeit die Hälfte der maximalen Wachstumsgeschwindigkeit ist.

Vergleicht man die beiden Größen R und G , so läßt sich, sofern die übrigen notwendigen Nährstoffe in optimalen Mengen angeboten werden, das absolute Wachstum = G mit steigender Konzentration des Minimumstoffes beliebig vergrößern, während die Wachstumsgeschwindigkeit über ein je nach der Bakterienart charakteristisches Maximum R_M nicht hinausgehen kann. Das zeigen auch die beiden Gleichungen:

$$\text{I. } G = K \cdot C; (C \rightarrow \infty; G \rightarrow \infty)$$

$$\text{II. } R = R_M \cdot \frac{C}{C_1 + C}; (C \rightarrow \infty; R \rightarrow R_M)$$

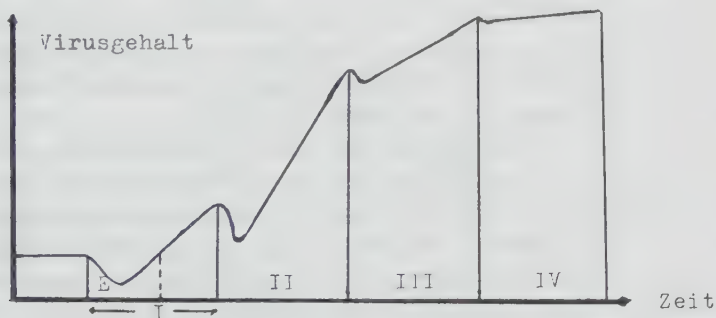
Gleichung I ergibt eine Gerade; Gleichung II ergibt eine Hyperbel, die sich bei steigenden Werten von C der Geraden $R = R_M$ mehr und mehr nähert, ohne sie zu überschreiten. Die große Schwierigkeit, die Gesetzmäßigkeiten des Viruswachstums festzustellen, besteht darin, daß die Viren selbst keine eigenen Stoffwechsel besitzen und sich daher nur in lebenden Zellen vermehren können, wobei praktisch ihre Vermehrung eine aktive Leistung der Wirtszelle ist. Daraus folgen 2 entscheidende Tatsachen:

1. Man kann die Abwehrvorgänge des Gewebes gegen das Eindringen und die Vermehrung der Viren niemals völlig ausschalten, wie etwa bei den Bakterien, sondern erhält in jedem Fall ein von den Abwehrkräften des infizierten lebenden Objektes überlagertes Viruswachstum.
2. Da für die Viren eine solche Abhängigkeit gegenüber lebenden Zellen besteht, muß das Wachstum je nach dem Gewebe, in dem es sich abspielt, mehr oder weniger große Unterschiede zeigen. In der Tat zeigen Blumenthal und Moritsch (5) anhand von Viruswachstumskurven, daß bei gleichem Erreger, je nach dem Organ, in dem die Vermehrung bestimmt wurde, erhebliche Unterschiede bestehen.

Kurz nach dem Eindringen des nucleinsäurehaltigen Teiles zerfallen die Viruspartikel, verlieren ihre Infektiosität und entziehen sich allen Nachweismethoden. Hierdurch wird eine gewisse Zeit nach der Infektion (Penetrationszeit) das Phänomen der Eklipse bedingt; es muß aber betont werden, daß auch im weiteren Verlauf des Wachstums ein großer Teil der Viren durch das gleiche Phänomen sich beim Messen nicht erfassen läßt. Hinzu kommen noch die Ungenauigkeiten, die in den üblichen Methoden des Virusnachweises begründet sind (13). Nach Blumenthal (5) bedingen schon ganz geringe Temperaturänderungen von 0,5 - 1°C erhebliche Unterschiede im Verlauf der Wachstumskurven. Die Viren zeigen weiterhin das Phänomen der Interferenz (34, 35, 36, 48); ähnliches entfällt bei dem In-vitro-Wachstums von Bakterien. Nach dem heutigen Stand der Untersuchungen scheint die Vermehrung der Viren einem gewissen Zyklus unterworfen zu sein, wie wir ihn ähnlich aber auch bei den Malaria plasmodien finden. Allerdings schwanken die von den einzelnen Autoren angegebenen Zeiten für das Intervall innerhalb der Überschwemmungsphasen zwischen Stunden und Tagen (18, 52, 53). Wenn auch Bakterienwachstum und Viruswachstum große Unterschiede zeigen, so darf man sich aber

nicht dazu verleiten lassen, das Gemeinsame zu übersehen.

In einer Arbeit von Köhler (52, 53) zeigt die Dynamik der Virusvermehrung sogar eine große Ähnlichkeit mit Bakterienwachstumskurven (Latenzphase, Exponentialphase, stationäre Phase, Reduktionsphase). Doch dürfte diese scheinbare Ähnlichkeit durch ganz andere Ursachen hervorgerufen sein, so daß diese Begriffe, denen bei der Bakterienvermehrung ganz bestimmte Ursachen zugrunde liegen, nicht ohne weiteres zur Charakterisierung einer Viruswachstumskurve angewendet werden dürfen. Typisch für das Viruswachstum ist die zyklische Vermehrung und die Eklipse, die aber als Teil des ersten Zyklus aufzufassen ist. Eine allgemeine Viruswachstumskurve müßte demnach folgendermaßen aussehen:



Kurve 3: Allgemeine Viruswachstumskurve

E = Eklipse, die als Teil des I. Vermehrungszyklus aufzufassen ist.

I, II, III, IV = die einzelnen Vermehrungszyklen.

DIE MÖGLICHEN EINGRIFFE ZUR BEEINFLUSSUNG VON VIRUSERKRANKUNGEN

Es besteht natürlich ein großes Interesse, die Virusmultiplikation therapeutisch beeinflussen zu können. Trotz einer großen Anzahl von Versuchen (16, 81, 82) ist es bisher nur in einzelnen Fällen gelungen, eine Beeinträchtigung des Viruswachstums ohne Schädigung des Wirtsgewebes zu erreichen. Die Gründe hierfür liegen in der engen Verknüpfung des Viruswachstums mit dem Zellstoffwechsel, so daß jeder Eingriff in dieses System nicht nur zur Schädigung der einen, sondern auch der anderen Seite führen kann. Es kommt hinzu,

daß die Virusmultiplikation sich intrazellulär abspielt, und man das Therapeutikum durch die Schleuse der Zellmembran bringen muß, und letztlich der für die Praxis wesentliche Faktor, daß der Virusinfekt erst durch den bereits vollzogenen Zellschaden klinisch manifest wird. Also die Virusvermehrung ist bereits abgelaufen, wenn es zu klinischen Symptomen kommt (91). Ein ideales Virustherapeutikum müßte folgende Eigenschaften haben:

- a) es muß selektiv viruzid wirken, d.h. es muß schon in Konzentrationen die Viren abtöten, wo so gut wie keine Zellschädigung eintritt.
- b) die Diffusion durch die Zellmembran muß gut sein, weil nur in der Zelle die Virusvermehrung stattfinden kann.

Man hat mit allen möglichen Stoffen versucht, Virusinfekte zu beeinflussen, doch waren diese Versuche nicht von großem Erfolg gekrönt (16, 81, 82).

Vielleicht bieten die neuesten Versuche eine Möglichkeit, wonach halogenierte Nukleinsäurekomponenten dem Virus angeboten werden, damit sie den Stoffwechsel, der zur Synthese der Viren führt, durch Verdrängung der echten Purine und Pyrimidinkörper blockieren sollen (91). Aber auch heute noch kommt für die praktische Virusinfektionsbekämpfung nur die Mobilisierung oder die Verabreichung körpereigener Stoffe, also die Impfung und Hormontherapie in Frage. Bezüglich der Wirkung von Glucocorticoiden und unter diesen besonders über das Universaltherapeutikum Cortison sind in den letzten Jahren zahlreiche Arbeiten erschienen. Sowohl durch Tierversuche wie auch durch klinische Untersuchungen war man bestrebt, die Cortisonwirkung zu klären, doch ist dies bis jetzt keineswegs gelungen (62, 87).

Gerade in letzter Zeit sind starke Widersprüche auf diesem Gebiet aufgetaucht. Positive Resultate in Tierexperimenten lassen sich in klinischer Sicht nicht bestätigen (7, 87). Von den zahlreichen Versuchen auf diesem Gebiet seien nur einige erwähnt, um die Mannigfaltigkeit der Ergebnisse vor Augen zu führen.

1. Bei Virushepatitis wirkt Cortison günstig und statistisch gesehen krankheitsverkürzend (22, 23, 26, 27, 38, 54, 61, 77, 86, 95).
2. Bei der Poliomyelitis wirkt sich im Tierversuch Cortisonbehandlung stets ungünstig aus (68, 74, 75, 87).
3. Cortison wirkt klinisch günstig bei infektiöser Mononukleose und epidemischer Grippe (24, 37, 66, 84).
4. Bei mit Grippeviren infizierten Hühnerembryonen wirkt Cortison, vor der Infektion injiziert, ungünstig lebensverkürzend, während es nach der Infektion lebensverlängernd wirkt (7, 50).
5. Bei mit APR8 und EMC infizierten Mäusen fanden Wasielewski und Mitarbeiter (87), daß die Cortisonwirkung in erheblichem Maße von der Größe der Infektionsdosis abhängt.

Die Beantwortung der Frage über die Cortisonwirkung bei Virusinfekten wird noch problematischer, wenn man die bisher eindeutig erwiesene pharmakologische Wirkung des Cortisons in Erwägung zieht:

1. Förderung der Gluconeogenese durch vermehrten Eiweißabbau = katabole Wirkung und durch Hemmung der Eiweißsynthese = antianabole Wirkung (39).
2. Negative Eiweißbilanz (83).
3. Antiphlogistische, antiallergische und antipyretische Wirkung (83, 97).
4. Erhaltung des Glycogendepots der Leber, aber fördernde Wirkung auf die adrenalinbedingte Mobilisation des Leberglycogens.
5. Natriumretention und Kaliumausscheidung. Hierauf beruhen die Oedeme bei M. Cushing.
6. Kurzdauernde Cortisongaben heben die unspezifische Resistenz des Organismus, langdauernde schwächen sie.
7. Hemmung des mesenchymalen Wachstums und des enchondralen Wachstums der langen Röhrenknochen (79, 80).
8. Steigerung des Grundumsatzes um 50% infolge spezifisch dynamischer Wirkung der vermehrten Eiweißverbrennung (95).
9. Kilbourne und Daves fanden, daß unter Cortison ein nicht mäuseadaptierter Influenza-A-Stamm erheblich früher mäusepathogen wurde als bei Tieren, die kein Cortison erhielten (40).
10. Die einzige Ausnahme bezüglich der antianabolen Wirkung des Cortisons ist die Leber, weil hier eine kräftige Proteinsynthese unter Cortison stattfindet (85).
11. Permeabilitätserhöhung der Zellmembran, wodurch vor allem der Natriumgehalt des extrazellulären Raumes erhöht wird. Auch der Transport von Aminosäure durch die Zellmembran wird beeinflusst.
12. Cortison verhindert die Bildung saurer Mucopolysaccharide im Innern der Zelle und ihr Auftreten in der Gewebekultur. Dies hat vielleicht eine Bedeutung, weil der Angriffspunkt der Influenzaviren bei der haemagglutinatorischen Virusbestimmung ein Mucopolysaccharid der Erythrozytenoberfläche ist. Durch Zugabe von Mucopolysacchariden zur Erythrozytenaufschwemmung kann man die Haemagglutination durch Influenzaviren hemmen (60).
13. Begünstigung der Virämie infolge Permeabilitätserhöhung (74, 75).
14. Erhöhung der alkal. Phosphatase; hierauf beruht die Osteoporose bei M. Cushing (18b).
15. Keine Wirkung auf die Exotoxine, aber Verminderung der Resistenz gegen Endotoxine (62).

16. Cortison vermindert die Diapedese und Beweglichkeit der Leukozyten und ihre Fähigkeit, Fremdkörper abzubauen (1, 2, 3).

Für die Hauptwirkung bei Virusinfekten kommen wahrscheinlich folgende Möglichkeiten in Frage:

1. Beeinflussung des Eiweißstoffwechsels
 - a) Einwirkung auf die Virussyntese (49).
 - b) Änderung der Virusvirulenz (46, 68).
 - c) Einwirkung auf die Virusinterferenz (48).
2. Unspezifische Änderung der Resistenz und Abwehrlage des infizierten Organismus.

Bei den zahlreichen Versuchen von Kilbourne an Hühnerembryonen ließ sich bei Verabreichung von Cortison in der Viruswachstumskurve anfangs eine Hemmung der Vermehrung feststellen, der dann allerdings etwa 30 Stunden nach der Infektion eine gegenüber den Kontrollwerten gesteigerte Virusvermehrung folgte. Die initiale Hemmung ist nach Kilbourne durch die antianabole Wirkung des Cortisons bedingt, wobei es spezifisch die Virussyntese hemmen soll (49); die folgende überschießende Virusvermehrung soll durch Hemmung der Autointerferenz bedingt sein. Durch Versuche an unserem Institut konnte zwar die fördernde Wirkung auf die Virusvermehrung festgestellt werden, die initiale Hemmung ließ sich bei Cortisonverabreichung vor der Infektion nicht bestätigen (7).

Ein klares Bild von der Cortisonwirkung bei Virusinfekten ist also zur Zeit noch nicht gegeben. Wie aus den zahlreichen Versuchen zu ersehen ist, sind folgende Faktoren für die günstige oder ungünstige Wirkung des Cortisons verantwortlich:

1. die Art des Virus
2. die Art des Versuchstieres
3. der Zeitpunkt der Medikation
4. die Höhe der Infektionsdosis.

Die Veränderung eines dieser vier Faktoren bei Gleichbleiben der übrigen Faktoren kann schon eine vorher günstige Wirkung in eine ungünstige Wirkung und umgekehrt verwandeln.

ALLGEMEINE THEORETISCHE GRUNDLAGE DES PRAKTISCHEN TEILES

Um die Cortisonwirkung auf die Viren möglichst ungestört von komplizierten Gegenreaktionen verfolgen zu können, wählten wir das 10 Tage alte Brutei, das sich von den anderen Versuchsobjekten durch folgende Vorzüge auszeichnet:

- a) es ist billig und leicht zu beschaffen.
- b) der Hühnerembryo ist am 10. Tage noch frei von latenten Infektionen und hat keine Fähigkeit zur Antikörperbildung, so daß wir bezüglich der Reaktion auf Virusinfekte keine komplizierten Überlagerungen haben (21, 98).

Da die Viren der Influenzagruppe eine starke Vorliebe für die Chorioallantoismembran des Hühnerembryos haben, wählten wir die eiadaptierten Influenzastämme B-Lee und APR8, um die Wirkung des Cortisons auf sie zu erforschen (8, 9, 10, 11).

Serologisch lassen sich 3 verschiedene Anteile der Grippeviren differenzieren (72, 73):

- a) das S-Antigen, das typenspezifisch ist.
- b) ein stammspezifisches Antigen, das wahrscheinlich mit den Agglutininen identisch ist.
- c) eine wirtsspezifische Komponente.

Chemisch lassen sich bei B-Lee und APR8 folgende Bestandteile isolieren (72, 73, 90):

APR8:	Proteine	65%
	Kohlehydrate	7,3%
	Fette	23,4%
	DNS schwankend	0,05 - 1,5%
	RNS weniger schwankend	0,9%
B-Lee:	Proteine	63,6%
	Kohlehydrate	9,4%
	Fette	22,5%
	DNS	3% weniger schwankend
	RNS	0,9%

Die Verbreitung der Influenzaviren im infizierten Brutei (8, 9, 10, 11):
Noch Burnet glaubte, daß bei der Infektion des Virus in die Amnionhöhle die Viren sich nur vermehren könnten, wenn sie über den Respirationsweg in den Embryo gelangen würden. Diese Behauptung stützte sich auf den Versuch, wonach Trypanblau, das in die Amnionhöhle gespritzt wurde, am 12. Bebrü-

tungstag im Respirations- und Verdauungstrakt erschien. Doch später stellte man fest, daß sich eine Vermehrung auch im Entoderm der Allantoismembran abspielt.

Man kann also sagen, daß die Vermehrung der Grippeviren zwar hauptsächlich im Respirationstrakt stattfindet, doch vermehrt sich das Virus mindestens ebenso gut in der Chorioallantoismembran des Hühnerembryos (8, 9, 10).

METHODIK

Bei unseren Untersuchungen ging es im wesentlichen um die Frage, ob sich beim Grippeinfekt des Hühnerembryos durch Cortison der Virusgehalt in der Allantoisflüssigkeit meßbar beeinflussen läßt.

Viren:

Wir verwendeten in unseren ersten 2 Versuchen den Influenza-APR8-Stamm, der hier im Hygiene-Institut in Mainz seit längerer Zeit durch Eipassagen gezüchtet wird. Nachdem wir aber bei ihm keinerlei Cortisonwirkung im Embryo bei einer Dosierung von 9 mg/kg feststellen konnten, gingen wir zum Influenza-B-Lee-Stamm über, den wir von den Behringwerken in Marburg erhielten. Vor Beginn der eigentlichen Versuche wurde der Stamm über mindestens eine Eipassage gezüchtet.

Bruteier:

In allen Versuchen wurde das 10 Tage lang bebrütete Hühnerei benutzt, wobei die Temperatur des Brutschrankes bei 37,5°C lag.

Cortison:

Als Ausgangslösung diente uns eine wässrige Suspension von Cortisonacetat (Incortin "Merck" 25 mg/ml).

Wir spritzten jedesmal 0,2 ml der 1:10 verdünnten Ausgangslösung in den Dottersack. Das entspricht bei einem mittleren Gewicht eines Eies von 55 g einer Dosierung von 9 mg/kg. Alle Verdünnungen, auch die Verdünnungen der Virussuspensionen, wurden mit physiologischer Kochsalzlösung vorgenommen.

Markierung und Kontrolle auf Befruchtung:

Am 8. Tage wurden die Eier durchleuchtet. Der Embryo ist zu dieser Zeit gut sichtbar und sehr beweglich. Die Gefäßzeichnung ist sehr deutlich. Zum Versuch wurden nur solche Eier verwendet, bei denen sich der Embryo eindeutig

bewegte. Die Lage und Begrenzung der Luftblase wurde auf der Eischale eingezeichnet und ein gefäßfreies Dreieck zwischen 2 Gefäßen am unteren Rand der Luftblase markiert.

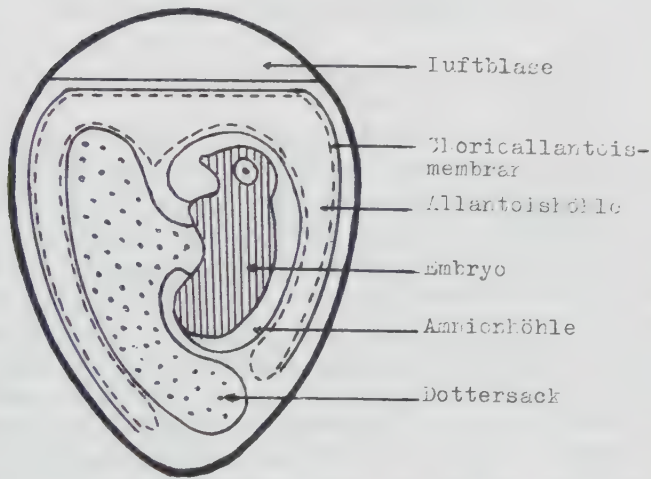


Abb. 1 Längsschnitt durch ein 10 Tage bebrütetes Hühnerei (schematisch)

Injektion in den Dottersack

Das Ei wurde in aufrechter Stellung (Luftblase nach oben) mit einem mit Alkohol angefeuchteten Tupfer an der Bohrstelle am oberen Eipol abgerieben. Dann setzten wir mit einer ausgeglühten Nadel ein Bohrloch durch die Schale. Die Injektion nahmen wir mit einer sterilen Kanüle vor, die etwa 4 cm auf den unteren Eipol zu vorgeschoben wurde. Das Bohrloch verstopften wir mit flüssigem Paraffin.

Injektion in die Allantoishöhle

Hierbei ist es nötig, eine Ausgleichsöffnung in der Gegend der Luftblase zu bohren, da sonst die injizierte Flüssigkeit wieder ausfließt. Zuerst wurde

auch hier bei senkrechter Haltung der Kanüle beimpft. Nach Desinfektion mit Alkohol wurde ein Bohrloch in dem markierten gefäßfreien Dreieck gesetzt. Die Kanüle wurde durch die Öffnung fast senkrecht mit einer kleinen Neigung zum Eimittelpunkt etwa 2 cm vorgeschoben. Es stellte sich jedoch heraus, daß der Prozentsatz an nichtinfizierten Eiern relativ hoch war. Wahrscheinlich war die Kanüle oft zwischen Schale und Schalenhaut des Eies gelangt. Wir führten daraufhin die Kanüle waagrecht an derselben Stelle etwa 5 mm tief ein, und diese Methode führte zu vollem Erfolg.

Entnahme der Allantoisflüssigkeit und Abtötung der Embryonen

Zu der gewünschten Zeit nach der Injektion wurden die Eier aus dem Brutschrank genommen und 30 Min. ins Tiefkühlfach (-20°C) gelegt und so die Embryonen durch Kälte abgetötet. Um bei der Entnahme der Allantoisflüssigkeit Blutaustritte aus Gefäßen zu vermeiden (Änderung des Virusgehaltes durch Bindung der Viren an Erythrozyten), wurden die Eier noch etwa 4 - 10 Stunden in aufrechter Stellung (Luftblase nach oben) bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. So erreichten wir ein Kollabieren der Gefäße durch Senkung des Blutes. Wir stellten durch Versuche fest, daß die Embryonen, 30 Minuten einer Temperatur von -20°C ausgesetzt, sicher tot sind, während sie, bei $+4^{\circ}\text{C}$ allein aufbewahrt, noch nach 5 Stunden Lebenszeichen gaben. Durch einen Zirkulärschnitt mit einer sterilen Schere etwa 2 mm oberhalb des unteren Randes der Luftblase wurde das Ei geöffnet, nachdem die Schale vorher mit Alkohol desinfiziert worden war. Mit einer sterilen Pinzette wurden die Membranen vor der Allantoisflüssigkeit abgehoben. Die Allantoisflüssigkeit konnte dann durch Einkippen in ein steriles Reagenzglas bequem gewonnen werden. Bis zur Bestimmung des Virusgehaltes im Hirst-Test vergingen nie mehr als 2 Stunden nach der Entnahme.

Bestimmung des Virusgehaltes

A. Methode von Hirst (31, 32)

Wir benutzten den klassischen Hirst-Test mit 0,8 ml NaCl-Lösung (physiol.) und 0,2 ml Virussuspension im 1. und 0,5 ml NaCl-Lösung (physiol.) in den übrigen 11 Röhrchen, wobei jeweils 0,5 ml überpipettiert wurde. Alle Röhrchen erhielten 0,5 ml Hühnererythrozyten 1:200 verdünnt. Hieraus läßt sich eine Verdünnung von 1:10 im 1. Röhrchen und ein Verdünnungsfaktor von 2 für die Verdünnungsreihe berechnen. Als Titer nahmen wir den Reziprokwert der höchsten Verdünnung an, bei der noch eine Haemagglutination sichtbar war. Abgelesen wurde nach einer Stinde. Bei Virussuspensionen, bei denen

sich auf diese Art ein Titer von über 100 ergab, legten wir eine 2. Verdünnungsreihe an, wobei ins 1. Röhrchen 0,2 ml der 1 : 10 verdünnten Virussuspension pipettiert wurden. Hierbei haben wir im 1. Röhrchen eine Verdünnung von 1 : 100, im 2. 1 : 200 usw. (Verdünnungsfaktor = ebenfalls 2). Als Endtiter nahmen wir die höchste Verdünnungsstufe aus den beiden Verdünnungsreihen an. Das durch mehrmaliges Zentrifugieren und Auswaschen (mit physiol. NaCl-Lösung) gewonnene Hühnererythrozytenkonzentrat ließ sich nicht viel länger als 8 Tage benutzen. Es zeigte nach dieser Zeit oft Hämolyse beim Verdünnen, aber auch in den Fällen, in denen keine Hämolyse auftrat, war seine agglutinatorische Fähigkeit gegenüber dem Virus bedeutend herabgesetzt.

Berechnung des mittleren Virusgehaltes einer Gruppe

Nach einer Stunde wurde das Röhrchen mit der letzten Haemagglutination abgelesen; daraus wurde der Titer anhand der Verdünnungsreihe berechnet und als mittlerer Titer das arithmetische Mittel der einzelnen Titerwerte der Gruppe angenommen.

Beim Hirst-Test wird oft nicht der Titer angegeben, sondern das Röhrchen, in dem die letzte Agglutination auftritt; dies ist durchaus korrekt. Wird aber hierbei z. B. aus 3 verschiedenen Werten ein sogenanntes "mittleres Röhrchen" angegeben, so ist das nicht ganz richtig.

Beispiel:

1. Wert = 8 Röhrchen	)	
	)	
2. Wert = 2 Röhrchen	)	"mittleres Röhrchen" = 4.
	)	
3. Wert = 2 Röhrchen	)	

Nehme ich aber nun von den 3 verschiedenen Virussuspensionen, die diese 3 Werte ergaben, je 1 ml und mische sie, so ergibt sich für diese Lösung im Hirst-Test folgender Titer:

$$\begin{array}{r} 1280 \\ 20 \\ \hline 20 \\ 1320 : 3 = 440 = \text{Titer der Mischung;} \end{array}$$

das entspricht einem 6.-7. Röhrchen = tatsächliches mittleres Röhrchen. Man sieht deutlich den Unterschied, der um so größer ist, je stärker der Maximalwert von den übrigen Werten abweicht. Es kommt daher, weil die Röhrchenzahl an sich eine logarithmische Angabe des Verdünnungstiters ist.

B. Bestimmung der ID 50

Je 1 ml der Allantoisflüssigkeiten der Eier einer Gruppe wurden gemischt und von dieser Lösung eine Verdünnungsreihe mit dem Verdünnungsfaktor 10 angelegt. Mit jeder Verdünnung dieser Verdünnungsreihe wurde eine Gruppe von 2 Eiern (10 Tage lang bebrütet) in die Allantoishöhle beimpft. Nach 48 Stunden wurde die Bebrütung unterbrochen und die Infizierung oder Nichtinfizierung haemagglutinatorisch bestimmt. Die ID 50 wurde nach Reed und Muench (69) berechnet.

Berechnung der ID 50 nach Reed u. Muench (69)

Die Berechnung beruht auf folgenden Grundsätzen:

1. Jedes Tier, das bei einer bestimmten Viruskonzentration infiziert wird (allgemein = Erregerkonzentration), wäre auch bei allen stärkeren Viruskonzentrationen als diese infiziert worden.
2. Jedes Tier, das bei einer bestimmten Viruskonzentration nicht infiziert wird, wäre auch bei allen niedrigeren Viruskonzentrationen als diese nicht infiziert worden.

Nach diesen Grundsätzen wird ein bestimmter Quotient = Q für jede Virusverdünnung berechnet:

$$Q = \frac{\text{Gesamtzahl aller infizierten Tiere}}{\text{Gesamtzahl aller infizierten Tiere} + \text{Gesamtzahl aller nichtinfizierten Tiere}}$$

Die Mortalität in % für jede Virusverdünnung der Verdünnungsreihe beträgt dann:

$$\text{Mortalität in \%} = 100\% \cdot Q$$

Die ID 50 liegt meist zwischen 2 Verdünnungen, es muß also interpoliert werden. Zu diesem Zwecke wird ein gewisser Abstandsfaktor nach folgender Formel berechnet:

$$A = \frac{\text{Kleinste Mortalität über 50\%} - 50\%}{\text{Kleinste Mortalität über 50\%} - \text{höchste Mortalität unter 50\%}}$$

$$\log \text{ ID 50} = \log (\text{Verdünnung der kleinsten Mortalität über 50\%}) + (\text{Abstandsfaktor} \cdot \log \text{ des Faktors der Verdünnungsreihe}).$$

Beispiel:

Verdün- nung	Verhältnis der Infizierten einer Gruppe zur Gruppenzahl	Infizierte insgesamt	Nicht- infizierte	Q	Mortalität
10^1	4/4	15 = (4+4+3+3+1)	0 = (4-4)	15/15	100 %
10^2	4/4	11 = (4+3+3+1)	0 = (4-4)	11/11	100 %
10^3	3/4	7 = (3+3+1)	1 = (4-3)	7/8	87 1/2 %
10^4	3/4	4 = (3+1)	2 = (4-3+1)	4/6	66 2/3 %
10^5	1/4	1	5 = (4-1+2)	1/6	16 2/3 %
10^6	0/4	0	9 = (4-0+5)	0/9	0 %
10^7	0/4	0	13 = (4-0+9)	0/13	0 %
10^8	0/4	0	17 = (4-0+13)	0/17	0 %

Tabelle 1. Berechnung der ID 50 für eine bestimmte Virussuspension.

Abstandsfaktor = 0,333

Die ID 50 = $10^{4,333}$

ALLGEMEINE VERSUCHSANORDNUNG

Die Hälfte aller zur Verfügung stehenden Eier wurde stets am 9. Bebrütungstag mit Cortison (im Dottersack) beimpft; die übrige Hälfte erhielt zur gleichen Zeit ein gleichgroßes Volumen NaCl-Lösung (physiol.). Um die Vermehrung der Viren im Ei zeitlich genau erfassen zu können, wurde zu bestimmten Zeiten nach der Infektion eine Gruppe mit Cortison und eine gleichgroße Gruppe ohne Cortison gleichzeitig aus dem Brutschrank genommen und sofort durch Kälte abgetötet, um die Vermehrung der Viren, die nur in lebenden Zellen weiterwachsen, zu unterbrechen. Der Virusgehalt in der Allantoisflüssigkeit wurde mittels Hirst- und ID 50-Methode bestimmt.

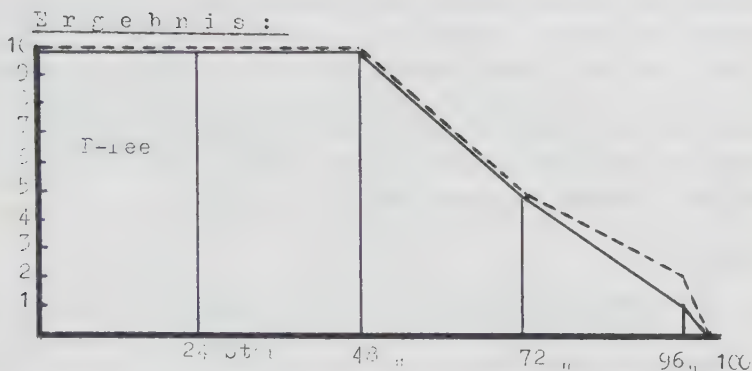
I. Versuch:

Bevor wir uns der mühsamen Virusgehaltsbestimmung zuwandten, wollten wir zunächst einmal die Frage klären, wie sich Cortison beim Grippeinfekt des Hühnerembryos bezüglich der Absterbezeit der Embryonen verhält:

Eine Gruppe von 10 Eiern erhielt am 9. Bebrütungstag eine Cortisongabe von 9 mg/kg. Eine gleichgroße Gruppe erhielt 0,2 ml physiologische Kochsalzlösung pro Ei. 24 Stunden später infizierten wir beide Gruppen mit einer 1 : 10 verdünnten B-Lee-Suspension (0,2 ml in die Allantoishöhle), deren unverdünnte Stammlösung einen Titer von 80 hatte. Wir gaben bei jedem Eingriff zugleich mit der Beimpfung 500 E Penicillin und 200 γ Streptomycin pro Ei. Nach 10, 24, 32, 48, 72, 96 und 100 Stunden wurden die Eier durchleuchtet, um die Zahl der zwischen den einzelnen Zeiten gestorbenen Embryonen festzustellen. Dabei dienten uns folgende Veränderungen als Zeichen für den Tod des Embryos:

1. Fehlen der Embryobewegung im Ei,
2. Kollabieren der Gefäße, die dadurch wesentlich dünner erscheinen als im lebenden Zustand,
3. Verlust der leuchtendroten Farbe der Gefäße, die dadurch kontrastärmer erscheinen,
4. Verlust der Pulsation der Gefäße.

Entscheidend hierbei ist nicht ein Merkmal, sondern das Gesamtbild, wobei der Farbe, der Dicke und dem Kontrast der Gefäße die größere Bedeutung zukommt. Während sicheres Feststellen von Bewegungen des Embryos zwar 100%ig für dessen Leben spricht, so spricht nicht umgekehrt das Fehlen von Bewegungen 100%ig für dessen Tod. Es zeigte sich nämlich, daß Embryonen, bei denen keine Bewegungen beim Durchleuchten festzustellen waren, beim Öffnen doch noch ein deutliches Pulsieren des Herzens aufwiesen. Deshalb kommt für den Tod des Embryos der Gefäßzeichnung eine größere Bedeutung zu.



Kurve 1: Das Absterben der mit Grippeviren infizierten Embryonen.
 Eine Gruppe zu 10 Embryonen mit Cortison und zum Vergleich eine Kontrollgruppe von 10 Embryonen ohne Cortison;
 Cortison 9 mg/kg 24 Std. vor Infektion injiziert.
 Y-Achse Auftragung der Zahl der noch lebenden Embryonen.
 X-Achse Auftragung der Zeiten der Durchleuchtung in Std. vom Zeitpunkt der Infektion an gerechnet.
 ----- mit Cortison _____ ohne Cortison

Die Tiere sterben, gleichgültig, ob sie mit Cortison oder mit NaCl-Lösung vorbehandelt sind, innerhalb eines Zeitraumes von 48 bis 100 Stunden. Selbst 96 Stunden nach der Infektion sind noch nicht alle Embryonen tot.

Bemerkungen:

Es ist zwar ein geringer Unterschied zwischen den Absterbezeiten der Cortisonwerte und Kontrollwerte vorhanden, doch darf man dies in Anbetracht der geringen Zahl der Versuchstiere nicht überbewerten. Man kann aber mit großer Sicherheit behaupten, daß Cortison beim Grippeinfekt des Embryos keine nachteiligen Wirkungen auf den Krankheitsverlauf hatte.

II. Versuch:

Um möglichst unbeeinflusste natürliche Bedingungen im Hühnerembryo zu schaffen, verzichteten wir zunächst darauf, durch Antibiotikagabe die bakterielle Begleitinfektion zu hemmen.

Versuchsanordnung:

9 Gruppen zu je 4 Eiern erhielten am 9. Bebrütungstag eine einmalige Cortisoninjektion von 9 mg/kg, zu gleichen Zeit erhielten ebenfalls 9 Gruppen zu je 4 Eiern 0,2 ml NaCl-Lösung (physiol.) pro Ei. 24 Stunden später wurden alle 18 Gruppen mit einer APR8-Virus suspension 1 : 100 verdünnt infiziert (0,2 ml pro Ei). Die unverdünnte VirusstammLösung hatte einen Titer von 4000. Nach 1 Stunde, 2 Std., 5 Std., 8 Std., 10 Std., 15 Std., 20 Std., 30 Std., 48 Std. wurde der Virusgehalt haemagglutinatorisch festgestellt.

Ergebnis:

1. Nach 10 Stunden trat sowohl bei den mit Cortison behandelten Eiern als bei den Kontrollwerten die erste Haemagglutination auf.
2. Der höchste mittlere Titer war 20 Stunden nach der Infektion vorhanden, die 30- und 48-Stunden-Werte waren eindeutig niedriger.
3. Bei einer nach 30 Stunden durchgeführten Durchleuchtung waren bereits alle Embryonen tot.
4. Unterschiede zwischen Cortisonwerten und Kontrollwerten waren nicht sicher vorhanden.

III. Versuch:

Auch hier verzichteten wir auf Antibiotikaschutz, um die natürlichen Bedingungen des Embryos möglichst unbeeinflusst zu lassen.

Versuchsanordnung:

Von 18 Gruppen zu je 4 Eiern erhielt die eine Hälfte am 9. Bebrütungstag eine einmalige Cortisongabe von 9 mg/kg; die andere Hälfte erhielt 0,2 ml physiologische Kochsalzlösung. Nach 24 Stunden wurden alle Eier mit einer APR8-Virus suspension 1 : 100 verdünnt infiziert (0,2 ml/Ei in die Allantoishöhle). Die unverdünnte VirusstammLösung hatte einen Titer von 160. Nach 0 Std., 4 Std., 8 Std., 12 Std., 16 Std., 27 Std., 32 Std., 36 Std., 38 Std. wurde der Virusgehalt der Allantoisflüssigkeit haemagglutinatorisch festgestellt.

Ergebnis:

1. Es trat erst 27 Stunden nach der Infektion die erste Haemagglutination auf.
2. Die höchsten haemagglutinatorischen Titer ergaben sich ebenfalls nach 27 Stunden.
3. Nach 32 Stunden waren bereits alle Embryonen tot.

4. Ein Unterschied zwischen Cortisonwerten und Kontrollwerten war nicht sicher vorhanden.

Bemerkungen:

1. Das spätere Auftreten der ersten Haemagglutination im Vergleich zum 2. Versuch ist wahrscheinlich auf die geringere Infektionsdosis zurückzuführen.
2. Bei der Untersuchung der entnommenen Allantoisflüssigkeit auf Bakterien (Ausstrich auf Agar-Platte) ließ sich bei 7 von 8 Eiern der 35-Stunden-Gruppe eine bakterielle Verunreinigung feststellen.
Das relativ frühe Absterben in Versuch II und III ist wahrscheinlich durch Bakterieninfekt bedingt.

IV. Versuch:

Um auszuschließen, daß der erhöhte Virusgehalt unter Cortison, den wir bei der haemagglutinatorischen Methode der Versuche II und III gefunden hatten, auch durch inkomplette Viruskörper bedingt sein könnte, wählten wir die ID 50-Methode für die Virusgehaltsbestimmung. Wir achteten peinlichst darauf, alle nur denkbaren unsterilen Manipulationen auszuschließen.

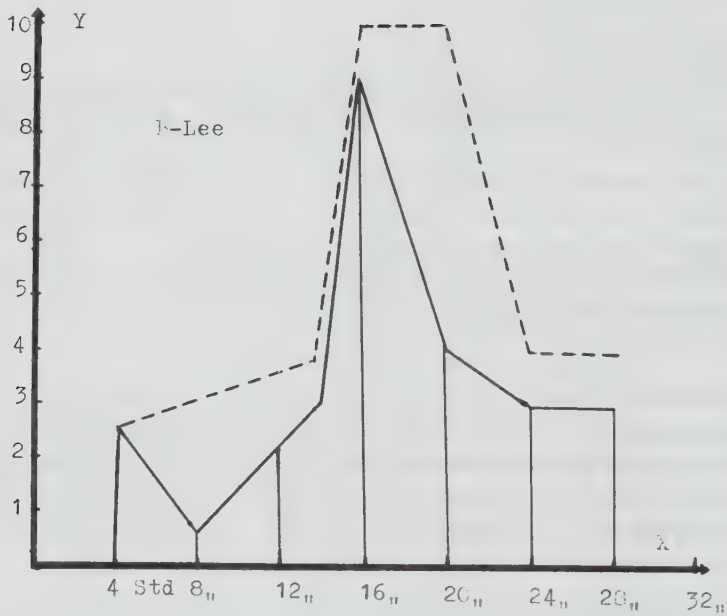
Versuchsanordnung:

Es wurden wiederum Vierergruppen gemacht. Cortison 9 mg/kg wurde der Hälfte der Eier in den Dottersack injiziert. 24 Stunden später wurden alle Eier mit einer 1:10 verdünnten Influenza-B-Lee-Virussuspension (0,2 ml in die Allantoishöhle) infiziert. Die unverdünnte Virusstammlösung hatte einen Titer von 2560. Der Virusgehalt der Allantoisflüssigkeit wurde mittels ID 50-Methode bestimmt. Zwischen Entnahme der Allantoisflüssigkeit und Neuinfizierung zwecks ID 50-Bestimmung vergingen nicht mehr als 3 Stunden.

Ergebnis:

(siehe Kurve 2 auf der folgenden Seite)

Ergebnis:



Kurve 2: Viruswachstumskurve zu Versuch IV, Gruppen zu 4 Eiern; Cortison 9 mg/kg 24 Stunden vor Infektion injiziert.
Y-Achse = Auftragung des Virusgehaltes als dekad. Logarithmus des Verdünnungstiters der ID 50. X-Achse = Auftragung der Zeit in Stunden.

----- mit Cortison

— ohne Cortison

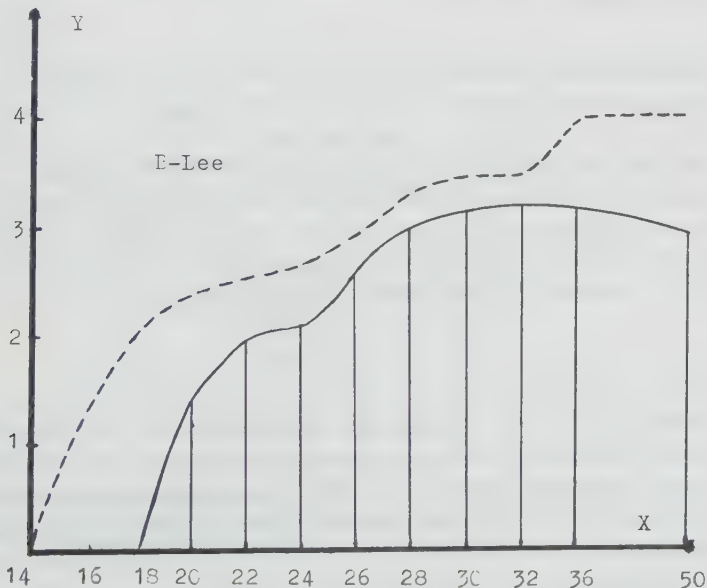
1. Der Virusgehalt der mit Cortison beimpften Eier war, abgesehen vom 4-Stunden-Wert, stets höher als der der Kontrollwerte.
2. Der steile Abfall nach dem 16-Stunden-Wert ist wahrscheinlich auf bakterielle Mischinfektion zurückzuführen.

I. Hauptversuch:

Wie die Vorversuche II, III, IV zeigten, konnte auch unter den sterilsten Bedingungen eine bakterielle Mischinfektion nie 100% verhindert werden. Deshalb gaben wir diesen konservativen Standpunkt auf und spritzten dem Embryo Antibiotika, weil wir uns dachten, daß auch ein sehr hoher Antibiotikaspiegel im Ei niemals das Viruswachstum so beeinflussen könne wie eine bakterielle Mischinfektion.

Um möglichst viele Zwischenwerte zu erhalten, wählten wir meist Zeitabstände von nur 2 Stunden. Hierbei mußten wir, da uns nur eine begrenzte Anzahl von Eiern zur Verfügung stand, statt Vierergruppen Zweiergruppen wählen. Wir spritzten bei jedem Eingriff pro Ei 500 E Penicillin und 200 γ Streptomycin gleichzeitig mit dem Cortison und der Virussuspension. Das Cortison wurde wie sonst am 9. Tag in einer Dosis von 9 mg/kg in den Dottersack injiziert und 24 Stunden später 0,2 ml einer 1 : 10 verdünnten B-Lee-Virussuspension in die Allantoishöhle. Titer der Virusstammlösung = 160.

Ergebnis:



Kurve 3: Viruswachstumskurve zu Hauptversuch I. Gruppe zu 2; Cortison 9 mg/kg 24 Std. vor der Infektion injiziert.
Y-Achse = Auftragung des dekad. Logarithmus der mittl. Haemag. Titer. X-Achse = Auftragung der Zeit in Std.
----- mit Cortison ————— ohne Cortison

Das relativ späte Auftreten der ersten Haemagglutination erst beim 16-Stunden-Wert (unter Cortison) ist auf die geringe Infektionsdosis zurückzuführen.

Wie im Vorversuch IV, sind auch hier die Werte unter Cortison eindeutig höher als ihre zugehörigen Kontrollwerte, und unter Cortison ist ein früheres Auftreten der ersten Haemagglutination zu verzeichnen.

II. Hauptversuch:

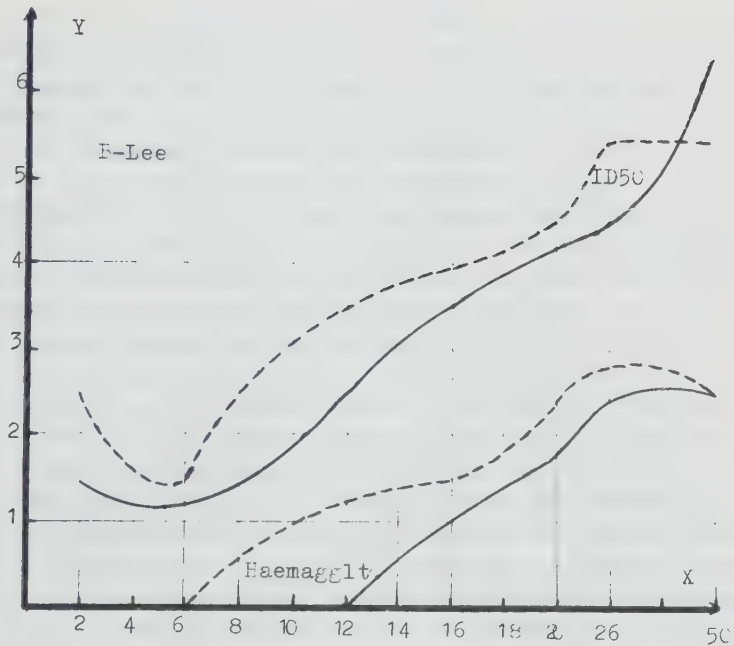
Von 14 Gruppen zu je 4 Eiern wurde die Hälfte mit Cortison am 9. Tag beimpft (9 mg/kg). 24 Stunden später wurden alle 14 Gruppen mit einer 1 : 10 verdünnten B-Lee-Virussuspension (0,2 ml/Ei) infiziert. Die unverdünnte Virussuspension hatte einen Titer von 1280. Der Virusgehalt wurde mittels Hirst-Test und ID 50-Methode bestimmt. Aus technischen Gründen konnte bei der ID 50-Bestimmung die Allantoisflüssigkeit nicht frisch überimpft werden, sondern wurde mit Penicillin und Streptomycin versetzt (500 E und 200 γ /ml) etwa 14 Tage im Eisschrank bei -20°C aufbewahrt. Selbstverständlich wurden auch hier wieder wie bei Hauptversuch I bei jeder Beimpfung gleichzeitig Antibiotika injiziert.

Ergebnis: (siehe Kurve 4)

Wiederum ist unter Cortison zu allen Zeiten mit Ausnahme des 50-Stunden-Wertes eine deutliche Erhöhung des mittleren Virusgehaltes einer Gruppe gegenüber den Kontrollwerten festzustellen. Bei der ID 50-Methode, die dank ihrer größeren Empfindlichkeit im Vergleich zum Hirst-Test, schon den Virusgehalt der Stundenwerte unmittelbar nach dem Infekt erfaßt, ist eine deutliche Eklipse zu sehen. Der Unterschied der Cortisonwerte zu den Kontrollwerten ist hier ebenso deutlich wie bei der Haemagglutinationsmethode.

ERGEBNIS DER VERSUCHE

Das Wachstum des APR8-Stammes im Hühnerembryo zeigte keine objektiv meßbare Beeinflussung bei einer Cortisondosierung von 9 mg/kg, während sich der B-Lee-Stamm bezüglich der gleichen Cortisondosierung durchaus empfindlich zeigte. In allen Versuchen wurde das Cortison am 9. Bebrütungstag 24 Stunden vor der Infektion in den Dottersack injiziert. Sowohl haemagglutinatorisch als auch mit der empfindlichen ID 50-Methode konnte in den Versuchen mit dem B-Lee-Stamm festgestellt werden, daß der Virusgehalt in der Allantoisflüssigkeit bis etwa zur 30. Stunde nach der Infektion den der Kontroll-



Kurve 4: Viruswachstumskurve zu Hauptversuch II.
Gruppen zu 4 Eiern; Cortison 9 mg/kg 24 Std. vor der Infektion injiziert.
Y-Achse = Auftragung des dekad. Logarithmus der haemaggl. Titer sowie des Verdünnungstiters der ID50.
X-Achse = Auftragung der Zeit in Std.
----- mit Cortison
————— ohne Cortison

werte deutlich übertraf. Trotz dieser objektiv meßbaren Erhöhung des Virusgehaltes unter Cortison ließ sich aber kein eindeutiger Unterschied bezüglich der Absterbezeiten der Embryonen feststellen.

DISKUSSION

Die Unterschiede bezüglich der Cortisonwirkung zwischen dem APR8- und B-Lee-Stamm scheinen offensichtlich nicht qualitativer, sondern quantitativer Natur zu sein; denn bei einer Cortisondosierung von 150 mg/kg konnte ebenfalls eine erkennbare Beeinflussung des APR8-Stammes erzielt werden (7). Dafür sprechen auch die Versuche Kilbournes (48, 49), bei denen kein grundsätzlicher Unterschied der Cortisonwirkung bezüglich der beiden Virusstämme festgestellt werden konnte. Die initiale Hemmung, die in den Versuchen Kilbournes (49) sich so deutlich zeigt, ließ sich in unseren Versuchen selbst mit der empfindlichen ID 50-Methode nicht bestätigen. Allerdings muß berücksichtigt werden, daß Kilbourne in seinen Versuchen das Cortison meist 2 - 6 Stunden nach der Infizierung injizierte, wodurch die Unterschiede bedingt sein könnten; denn es ist eindeutig erwiesen, daß gerade der Zeitpunkt der Medikation bei Cortison eine entscheidende Rolle spielt (7, 50, 87). Kilbourne fand weiterhin bei der Injektion des Cortisons 24 Stunden vor der Infektion ein früheres Absterben der Cortisontiere gegenüber den Kontrollembryonen. Die Unterschiede waren aber nicht sonderlich groß (50); auch das ließ sich bei uns nicht feststellen, doch injizierten wir eine bedeutend geringere Infektionsdosis. Wie wir von der "Widerspenstigkeit" der Cortisonwirkung bei Virusinfekten wissen, genügt dies allein schon, um einen solchen Unterschied hervorzurufen.

Nimmt man an, daß für die Cortisonwirkung bei Virusinfekten die Permeabilität eine große Rolle spielt, so muß man folgendes beachten:

- a) Eine erhöhte Membrandurchlässigkeit spielt in erster Linie für die kleinen Ionen wie Na^+ und K^+ eine Rolle, doch werden die Viren, die um das Millionenfache größer sind, in ihrem Eindringungsvermögen ins Gewebe kaum beeinflusst.
- b) Die erhöhte Membrandurchlässigkeit kann aber das Nährstoff- und Sauerstoff-Angebot zur Zelle beeinflussen, da diese relativ kleinen Moleküle, nachdem sie durch den Blutstrom bis ins Gewebe herangeführt wurden, in die Zelle selbst nur durch Diffusion und osmotische Kräfte gelangen.
- c) Man kann sich denken, daß die erhöhte Membranpermeabilität zu einer Herabsetzung der Membranfestigkeit der Zellen führt, so daß diese nach dem Virusbefall schneller platzen und die Verbreitung der Viren ins Gewebe fördern.

Wie sich nun diese komplexe Wirkung in vivo auswirken kann, bleibe dahingestellt, doch kann man sagen, daß sie zu sehr unterschiedlichen Versuchsergebnissen führen kann.

Kilbourne behauptet, das Cortison greife in den Mechanismus der Virus-synthese ein und hemme andererseits den Vorgang der Interferenz. Hiernach soll die objektiv meßbare Änderung des Virusgehalts unter Cortison das Resultat zweier, was die Virusvermehrung anbetrifft, entgegengesetzter Wirkungen sein:

- a) Hemmung der Virussynthese,
- b) Hemmung der Autointerferenz,

wobei die Größe der beiden Wirkungen verschieden sein kann, was sich einerseits in Hemmung, andererseits in Förderung der Virusvermehrung gegenüber den Kontrollwerten auswirkt. Ungeklärt bleibt aber weiterhin die Frage, warum diese Cortisonwirkung sich durch andere Faktoren wie

- a) Medikationszeitpunkt
- b) Virusstamm
- c) Infektionsdosis
- d) Art und Abwehrlage des infizierten Organismus

in so starkem Maße beeinflussen läßt.

Gerade diese Frage interessiert uns am meisten, weil ihre Beantwortung gewisse Anhaltspunkte für die Cortisontherapie bei Viruserkrankungen geben könnte. Versuche an unserem Institut haben ohnedies die Bildung eines spezifischen Interferons fraglich gemacht und zu folgendem Ergebnis geführt (90):

- a) Ein Einfluß des Cortisons auf die Interferonbildung konnte nicht festgestellt werden.
- b) Es zeigte sich auch kein Unterschied im Wirkungsgrad zwischen dem Interferon des mit Cortison vorbehandelten Bruteies und dem Interferon des Bruteies ohne Cortison.
- c) Ferner konnte festgestellt werden, daß auch die der Allantoismembran zugesetzte Hanks-Lösung ohne inaktiviertes Virus, folglich auch ohne Interferon bei der Testung eine Hemmung des Viruswachstums zeigte.

Es taucht die Frage auf, ob es sich bei dem sogenannten Interferon nicht auch um einen völlig unspezifischen Stoff handeln könnte, der beim Zellverfall entsteht und der nicht allein durch Viren, sondern durch alle biologischen und physikalischen Reize gebildet wird, die Zellen zerstören.

Bei der Erforschung der Cortisonwirkung dürfen wir aber nicht nur die Wirkung am Viruswachstum betrachten, sondern auch den Effekt des Hormons auf den Gesamtorganismus einbeziehen.

Es ist pharmakologisch erwiesen, daß durch Cortisontherapie die ACTH-Ausschüttung der Hypophyse gebremst wird und sich in der Nebennierenrinde eine Inaktivitätsatrophie abspielt, wodurch beim Abklingen der Cortisonwir-

kung ein zeitweiser Glucocorticoidmangel resultiert.

Es ist ebenfalls nicht ausgeschlossen, daß durch Cortisonmedikation auch andere Drüsen, die von der Hypophyse aus gesteuert werden, beeinflußt werden können. Für die Hormone der Schilddrüse und der Gonaden ist eine Einwirkung auf den Verlauf einer Infektionskrankheit erwiesen (62, 76). Berücksichtigen wir diese Zusammenhänge und die Versuche Kilbournes (50) zusammen mit dem von v. Wasielewski (87) gefundenen Einfluß der Höhe der Infektionsdosis auf den Verlauf einer Viruserkrankung, so läßt sich folgendes sagen:

- a) Die günstige Wirkung von Cortison ist davon abhängig, ob die Zeit unmittelbar nach der Verabreichung in eine ganz bestimmte Phase des zyklischen Vermehrungsmechanismus der Viren fällt.
- b) Kurz nach dem Zeitpunkt der Medikation ist wahrscheinlich die Wirkung des Cortisons auf die Körperzellen am stärksten, weil nach längerer Dauer der Cortisonwirkung die Zellen möglicherweise nicht mehr so empfänglich für den Hormonreiz sind und vielleicht auch eine gewisse Leistungsminderung eingetreten ist.
- c) Die Höhe der Infektionsdosis ist deshalb von Bedeutung, weil von ihr das zeitliche Auftreten der Überschwemmungsphase der Viren in großem Maße abhängt.

Wurde das Cortison beim Grippeinfekt des Hühnerembryos 24 Stunden nach der Infektion injiziert, so wirkte es, was die Überlebenszeit anbetrifft, relativ günstig. In diese Zeit fällt nämlich, wie aus den Wachstumskurven zu ersehen ist, die "Überschwemmungsphase" der Grippeviren. Bei Cortisonmedikation 24 Stunden vor der Infektion war die Überlebenszeit der Embryonen gegenüber den Kontrollwerten deutlich verkürzt, vermutlich weil die Embryozellen durch den zu frühen Hormonreiz schon erschöpft waren.

Zusammenfassend kann gesagt werden:

Cortison könnte beim Grippeinfekt günstig und lebensverlängernd wirken, wenn die Cortisonmedikation in die Überschwemmungsphase der Viren fällt. Es wirkt wahrscheinlich ungünstig, wenn die Überschwemmungsphase in einen Zeitpunkt fällt, in dem die Cortisonwirkung bereits abgeklungen ist, weil

- a) die Gewebszellen durch den vorausgegangenen Hormonreiz geschwächt sind,
- b) die Nebenniere durch die Glucocorticoids substitution funktionell gebremst wurde.

Ob unter Cortison eine Änderung der Virusvirulenz eintritt, wird zur Zeit noch diskutiert (68, 87).

ZUSAMMENFASSUNG

Durch zwei Versuche und zwei Hauptversuche konnte festgestellt werden, daß unter Cortison der Virusgehalt in der Allantoisflüssigkeit gegenüber den Kontrollwerten erhöht ist.

Durch gleichzeitige Bestimmung des Virusgehaltes mit der ID 50-Methode konnte bewiesen werden, daß es sich nicht um eine Vermehrung von nicht-infektösen Viruspartikelchen handelt, sondern eine echte Virusvermehrung vorliegt. Bei Versuchen an Hühnerembryonen wurde bei einer Cortisondosierung von 9 mg/kg eine deutliche Beeinflussung des Virusgehaltes in der Allantoisflüssigkeit beim B-Lee-Infekt gefunden, wohingegen der APR8-Stamm bei gleicher Dosierung keine Cortisonempfindlichkeit zeigte.

Ein biphasischer Verlauf der Wachstumskurven im Sinne einer initialen Hemmung und einer folgenden überschießenden Virusvermehrung ließ sich nicht bestätigen. Wir fanden bis etwa zur 36. Stunde nach der Infektion unter Cortison eine laufende Erhöhung des Virusgehaltes, wobei aber bezüglich der Absterbezeiten kein signifikanter Unterschied vorhanden war. Das Phänomen der initialen Hemmung scheint vom Zeitpunkt der Medikation abhängig zu sein. Eine eindeutige Erklärung der Cortisonwirkung bei Virusinfekten läßt sich zur Zeit noch nicht geben.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Ballowitz, L. : Leucozytenfunktionen beim gesunden und kranken Kind. I. Mitteilung: Methoden zur Funktionsprüfung der Leucozyten.
Zbl. Bakt. I. Orig. 167, 529-548 (1957).
2. ders. : Leucozytenfunktionen...
II. Mitteilung: Einfluß verschiedener Bakterienarten und antibiotischer Mittel auf die Lebensäußerungen der Leucozyten in vivo.
Zbl. Bakt. I. Orig. 167, 548-561 (1957).
3. ders. : Leucozytenfunktionen...
III. Mitteilung: Verhalten der Leucozytenfunktionen beim Menschen.
Zbl. Bakt. I. Orig. 168, 95-140 (1957).
4. Bieling, R. : Die Pathogenese der Viruskrankheiten.
Zbl. Bakt. I. Orig. 160, 1/5, 131-139 (1953).
5. Blumenthal, H. T.,
 Greiff, D.,
 Pinkerton, H.,
 Dewitt, R. : Influenza. 1. The Hemagglutination and Infectivity Titre Curves of PR8 Influenza Virus Cultivated in Embryonated Eggs at Different Temperatures.
J. exp. Med. 91, 321-329 (1950).
6. Brummel, E.,
 Halkerston, J.,
 Reiss, M. : The Influence of Steroid Hormones on the Energetic Metabolism of the Adrenal Cortex in vitro.
J. of Endocrinology 10, 111-116 (1954).
7. Bünnagel, W. : Med. Diss. (Mainz 1959).
8. Burnet, F. M. : Med. J. Australia 2, 687 (1935).
(zit. n. Bernkopf).
9. ders. : Influenza Virus Infections of the Chick Embryo Lung.
Brit. J. exp. Path. 21, 147-153 (1940).
10. ders. : Influenza Virus Infections of the Chick Embryo by the Amniotic Route. I. General Character of the Infection.
Austr. J. exp. Biol. Med. Sci. 18, 353-360 (1940).
11. ders. : Re-Examination of the Influenza Virus Strain "Melbourne Egg".
Austr. J. exp. Biol. Med. Sci. 22, 173-178 (1944).

12. Caspersson, T.,
Thorson, K. G. :
Virus und Zellstoffwechsel.
Klin. Wschr. 31, 205-212 (1953).
13. Drescher, J. :
Beitrag zur Virusgehaltsbestimmung.
Zbl. Bakt. I. Orig. 169, 314-348 (1957).
14. Evans, H. J. :
Action of cortisone on developing chick embryo.
Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 83, 31-34 (1953).
15. Fong, J., Louie, R. :
Interference in Cortisone-Treated Hosts.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 84, 269-271 (1953).
16. Fischer, G.,
Gardell, S.,
Jorpes, E. :
Versuche über Stoffe mit selektiv veruzider Wirkung.
Zbl. Bakt. I. Orig. 161, 349-353 (1954).
17. Franciscis, P. and
W. Landauer :
Combined effects of cortisone and insulin on
developing chicken embryos.
Nature (Lond.) 184, 101-103 (1959).
18. Green, R. H.,
Freyman, M. W. :
A Method of Obtaining Influenza Virus Growth
Curves in Individual Eggs.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 71, 476-478 (1949).
- 18b. Frey, J. :
Die Bedeutung der NNR-Hormone für den Stoff-
wechsel energiereicher Phosphatverbindungen
der Nieren und damit für die Nierenfunktion.
2. Symp. dtsch. Ges. Endokrinol. 53-57 (1954).
19. Gillissen, G. :
Fragen der spezifischen und unspezifischen Be-
handlung bakterieller Erkrankungen unter beson-
derer Berücksichtigung der Tuberkulose.
Pharmazie 10, 19-23 (1955).
20. Gönnert, R. :
Über Virusmorphologie und Virusvermehrung.
Behring-Werk-Mitt. 25, 61 (1952).
21. Goodpasture, E. W.,
Woodruff, A. M.,
Budding, G. J. :
Vaccinal Infection of the Chorio-Allantoic
Membrane of the Chick-Embryo.
Am. J. Path. 8, 271-281 (1932).
22. Gross, H. :
Therapie akuter und chronischer Lebererkan-
kungen.
Ärzt. Praxis 11, 1951-1955 (1959).
23. Gross, H. und
Tilling, W. :
Klinische Erfahrungen mit Cortison bei der Be-
handlung akuter Infektionskrankheiten.
Dtsch. med. Wschr. 80, 223-226 (1955).

24. Gunn, W. and G. E. Breen: Influenzal pneumonia treated with cortisone and antibiotics.
Lancet II, 1003-1004 (1957).
25. Hallauer: Handbuch der Virusforschung.
3. Ergänzungsband (1958).
26. Hafter, E.: Zur Prednisontherapie der Hepatitis.
Méd. et Hyg. (Genève) 15, 429-433 (1957).
27. Heilmeyer, L.: Klinische Beobachtungen zur Infektbeeinflussung durch ACTH und Cortison bei Streptokokkenkrankheiten, Typhus abdominalis, Tuberkulose und Hepatitis epidemica.
Münch. med. Wschr. 96, 460-468 (1954).
28. Henle, G., Henle, W.: Interference between Inactive and Active Viruses of Influenza. IV. The Nature of the Interfering Agent.
Am. J. Med. Sciences 210, 369-374 (1945).
29. Henle, W., Henle, G., Kirber, M. W.: Interference between Inactive and Active Viruses of Influenza. V. Effect of Irradiated Virus on the Host Cells.
Am. J. Med. Sciences 214, 529-541 (1947).
30. Hinshelwood, C. N.: The Chemical Kinetics of the Bacterial Cell, 284 p.p., Clarendon Press Oxford 1946.
31. Hirst, G. K.: The Agglutination of Red Cells by Allantoic Fluid of Chick Embryo infected with Influenza Virus.
Science 94, 22-23 (1941).
32. Hirst, G. K.: The quantitative Determination of Influenza Virus and Antibodies by Means of Red Cells Agglutination.
33. Hoyle: Symt. on nature of Virus Multiplication.
Soc. of gen. Microbiology (1952).
34. Isaacs, A., Lindenmann, J.: Virus interference. I. The Interferon.
Proc. Roy. Soc. B. 147, 258-267 (1957).
35. Isaacs, A., Lindenmann, J., Valentine, R. C.: Virus interference. II. Some Properties of Interferon.
Proc. Roy. Soc. B. 147, 268-273 (1957).
36. Isaacs, A., Lindenmann, J.: Schweiz. Zschr. allg. Path. Bakt. 20, 640-646 (1957).

37. Jacobi, J. und H. G. Ilker: Grippe.
Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 65, 765-776 (1959).
38. Kalk, H. und E. Wildhirt: Die posthepatitische Hyperbilirubinämie eine häufige Folge-Krankheit der Hepatitis.
Med. Klin. 50, 1289-1294 (1955).
39. Karnofsky, D. A., Stock, C. C., Rhoades, C. P.: The effect of adrenal steroids on growth of chick embryo. Fed. Proc. 9, 290 (1950).
40. Kilbourne, E. D.: Influence of cortisone on adaptation of influenza A virus to mouse lung.
Fed. Proc. 12, 449-450 (1953).
41. ders.: Cortisone modification of the dynamics of influenza virus increase.
Fed. Proc. 15, 597 (1956).
42. ders.: Paradoxial effects of cortisone on influenza B Virus Infection of the chick embryo.
J. Clin. Invest. 31, 643 (1952).
43. Kilbourne, E. D., Horsfall, F. L.: Increased Virus in eggs injected with cortisone.
Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 76, 116-118 (1951).
44. Kilbourne, E. D., Tatenò, I.: In vitro effects of cortisone on multiplication of influenza B virus.
Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 82, 274-277 (1953).
45. Kilbourne, E. D.: The influence of cortisone on experimental viral infection. II. Effects on antibody formation and acquired immunity.
Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 90, 685-687 (1955).
46. ders.: Reactivation of non-infective virus in a cortisone-treated host.
J. exp. Med. 101, 437-450 (1955).
47. ders.: The influence of cortisone on experimental viral infection. III. Effects on certain dynamics of influenza virus increase.
J. exp. Med. 106, 851-862 (1957).
48. ders.: The influence of cortisone on experimental viral infection. IV. Negation of Interference as the mechanism by which cortisone induces increased virus yields.
J. exp. Med. 106, 863-881 (1957).

49. Kilbourne, E. D. : The influence of cortisone on experimental viral infection. V. Inhibition of influenza virus synthesis.
J.exp. Med. 106, 883-892 (1957).
50. ders. : The influence of cortisone on experimental viral infection. I. Prolongation of survival time and suppression of inflammation in chick embryos infected with influenza B virus.
J. Immunol. 74, 57-62 (1955).
51. Kliewe, H., Begriff und Wesen der Pathogenität, Infektiosität und Virulenz von Bakterien.
Wasielowski, E. V. : Ärztl. Forsch. 11, I/165-I/179 (1957).
52. Köhler, H. R. : Über die Pathogenese der Influenzainfektion des Hühnerembryos nach Virusinjektion in die Allantoishöhle.
Zbl. Bakt. I. Orig. 163, 92 (1955).
53. ders. : Das Viruswachstum und seine Besonderheiten.
Zbl. Bakt. 166, 454-461 (1956).
54. Kühn, H. A. : Die Therapie der Virushepatitis.
Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 63, 266-281 (1957).
55. Lambert, R. A. : Variations in the Character of Growth in Tissue Cultures.
Anat. Record. 6, 91-108 (1913).
56. Lange, A. : Leitfaden der Medizinischen Mikrobiologie (Tropon). München 1958.
57. Levaditi, C., Etude de la vie et de la Croissance des cellules in vitro à l'aide de l'enregistrement cinimatographique.
Comandon, J., Muttermilch, S. : Compt. Rend. Soc. biol. 24, 464-467 (1913).
58. Lodge, R. M. und J. Chem. Soc. 213-219 (1943).
Hinshelwood, C. N. :
59. Lwoff, A. und Ann. inst. Pasteur 73, 323 (1947).
Monod, J. :
60. Mancini, E. E. : Mucoproteinas de la sangre y des tejedo conec-
 tivo peritumoral en blastomas benignos y malignos.
Prensa medica argentina 39, 732-736 (1952).
61. Markoff, N. : Fortschritte der medikamentösen und diätischen
 Behandlung der Leberkrankheiten.
Schweiz. med. Wschr. 88, 1199-1203 (1958).

62. Melnotte, P.,
Herbeuval, R.,
Derby, G. : L'influence du terrain endocrinien sur les infections.
Biol. Médicale 47, 418-561 (1958).
63. Monod, J. : Annual Review of Microbiol. Vol. III, 371-392 (1949).
64. Nauck, E. G. : Die Pathologie der Viruskrankheiten.
Zbl. Bakt. I. Orig. 160, 1/5, 139-146 (1953).
65. Nigg, C.,
Crowley, J. H.,
Wilson, D. E. : The Use of Chick Embryo Tissues and Fluid ad Antigens in the Complement Fixation Reaction in Influenza.
J. Immunol. 42, 51-70 (1941).
66. Oldershausen, H. F. : Zur Klinik der zentralnervösen Grippekomplikationen.
Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 65, 780-785 (1959).
67. Pickmann, D. S.,
Ridley, A.,
Orgel, M.,
Blumenthal, H. T. : Effect of cortisone on growth of chick embryos during early embryogenesis.
Endocrinology 64, 790-794 (1959).
68. Poetschke, G. : Zur Theorie provozierender Faktoren bei der Poliomyelitis.
Klin. Wschr. 34, 284-291 (1956).
69. Reed, L. J.,
Muench, H. : A simple method of estimating fifty per cent endpoints.
Amer. J. Hyg. 27, 493-497 (1938).
70. Ryzkov, V. L. : Biochemische Bedingungen der Vermehrung der Viren.
Biochemistry of viruses. London 1958.
71. Schäfer, W. : Dtsch. med. Wschr. 41, 1825-1826 (1952).
72. Schramm, G. : Chemie der Viren.
Klin. Wschr. 31, 198-205 (1953).
73. ders. : Die Biochemie der Viren.
Berlin-Göttingen-Heidelberg 1954.
74. Schwarzmann, G. : Enhancing Effect of Cortisone upon Poliomyelitis Infection (Strain MEF 1) in Hamster and Mice.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 75, 835-838 (1950).

75. Schwarzmann, G.,
Gischer, A. :
Alteration of Experimental Poliomyelitis Infection
in the Syrian Hamster with the aid of Cortisone.
J.exp. Med. 95, 347-362 (1952).
76. Selye, H. :
Stress. I. Bd.
Ed. Med. Acta Inc., Montreal, Canada 1950.
77. Siede, W.,
Klamp, A. :
Die Behandlung der Virushepatitis mit Prednison.
Med. Klin. 51, 2210-2213 (1956).
78. Silver, Porter:
J. of Endocrinology 52, 518 (1953).
79. Sobel, H. :
Antagonistic Effect of cortisone and Growth Hor-
mone on the Developing Chick Embryo.
Soc. exp. Biol. Med. 97, 495-498 (1958).
80. Sobel, H. :
The Action of Cortisone on the Embryonic Cart-
ilage and Muscle in vitro.
Separatum Experimentia 14/11, 421-425 (1953).
81. Sprössig, M. :
Über die Möglichkeit der Prüfung virushemmender
Substanzen im exembryonierten Brutei.
Z. ges. Hyg. 3, 239-247 (1957).
82. Sprössig- M.,
Schabinski-Stefan, M. :
Einfluß des Wirkstoffes aus der Kapuzinerkresse
auf die intracelluläre Virussyntese.
Z. Hyg. 143, 215-222 (1956).
83. Sturm, A. :
Grundbegriffe der Inneren Medizin.
313-315 (1959).
84. Tilling, W. :
Klinische Möglichkeiten der hormonellen Beein-
flussung von Infektionskrankheiten.
Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 61, 239-242 (1955).
85. Trémolières, J. F. :
Intervention de quelques hormones stéroïdes dans
les équilibres cellulaires et tissulaires.
Paris: Masson et Cie 1956.
86. Voit, K. :
Cortison bei schwer verlaufenden Infektionskrank-
heiten.
Med. Klin. 53, 635-638 (1958).
87. Wasielewski, E. v.,
Knick, B.,
Bünnagel, W. :
Zur Beeinflussung des Virusinfektes durch Corti-
son.
Zbl. Bakt. I. Orig. 100, 43 (1960).
88. Wasielewski, E. v.,
Knick, B. :
Experimenteller Beitrag zur Cortisonbehandlung
am Tier nach Inokulation pathogener und apatho-
gener Mikroorganismen.
Z. exp. Med. 129, 548-559 (1958).

89. Wasielewski, E. v. : unveröffentlichte Versuche.
90. Wasielewski, E. v., Thiele, G. : Experimentelle Studien zum Wesen des Cortison-eingriffs bei Virusinfektionen unter besonderer Berücksichtigung von Interferenzmechanismen. Zeitschrift für Hyg. 147, 504-520 (1961).
91. Wasielewski, E. v. : Mündliche Mitteilungen.
92. Watanabe, J. : Proteinsynthesis in phage infected E. Biochemistry of Virus. London 1958.
93. Watson, B. K., Conns, A. H. : Studies on Influenza Virus Infection in the Chick Embryo using Fluorescent Antibody. J. exp. Med. 99, 419-428 (1954).
94. Weichsel, H. : Zur Kenntnis der anabolen Wirkung von Steroidhormonen. Forschungslaboratorien der Lannacher Heilmittel-Gesellschaft 1960.
95. Weissbecker, L. : Allgemeine Corticosteroidtherapie und ihre Durchführung bei endocrinen Störungen und Infektionskrankheiten. Verh. dtsh. Ges. inn. Med. 62, 253-264 (1956). ACTH und Corticosteroide in der Klinik. Klin. Wschr. 35, 898 (1957).
96. Wilbrandt, W. : Physiologie und Pharmakologie der Corticosteroide. Dtsch. med. J. 11, 277-282 (1960).
97. Wolf, H. J. : Einführung in die innere Medizin. 487-492 (1960).
98. Woodruff- A. M., Goodpasture, E. W. : The Susceptibility of Chorio-Allantoic Membrane of Chick Embryo to Infection with the Fowl-Pox Virus. Am. J. Path. 7, 209-222 (1931).

Ich danke Herrn Professor Dr. Klie we für die Gewährung des Arbeitsplatzes in seinem Institut sowie für die Übernahme des Korreferates.

Gleichzeitig danke ich Herrn Professor Dr. v. Wasielewski für die Überlassung des Themas und für seine wertvollen Ratschläge und die stete Hilfe bei allen Schwierigkeiten, die sich im Laufe der Arbeit ergeben haben.

Fräulein Liedke danke ich für die technische Assistenz bei der Durchführung der Versuche.

LEBENS LAUF

Am 29. November 1936 wurde ich als zweites Kind des Hauptlehrers Robert Stauter und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Ahrling, in Hopstädten/Nahe geboren.

Vom Herbst 1943 bis Herbst 1947 besuchte ich die katholische Volksschule zu Reinsfeld/Krs. Trier. Nach vierjährigem Grundschulbesuch kam ich im Herbst 1947 in die Selektta des sechsklassigen neusprachlichen Gymnasiums in Hermeskeil/Krs. Trier. Dort erhielt ich 1953 Obersekundareife. Anschließend war ich Schüler des neusprachlichen staatlichen Hindenburg-Gymnasiums zu Trier. Ostern 1956 legte ich an dieser Schule die Reifeprüfung ab.

Am 2. Mai 1956 begann ich das Studium der Medizin an der Philipps-Universität zu Marburg, wo ich nach dem 5. Semester die ärztliche Vorprüfung bestand. Nach dem 6. Semester ließ ich mich an der Johannes Gutenberg-Universität zu Mainz immatrikulieren. Nach dem Wintersemester 1962/1963 will ich in Mainz mein Staatsexamen ablegen.

